

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung

Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

**GESTEIGERTE PHAGOZYTOSERATE VON
ALVEOLARMAKROPHAGEN NACH INHALATIONSIMPfung
MIT EINEM POLYVALENTEN, BAKTERIELLEN
LYSATIMPfstoff IM TIERVERSUCH**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Ekkehard Rautenberg aus Löhnde

1976

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung

Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

**GESTEIGERTE PHAGOZYTOSERATE VON
ALVEOLARMAKROPHAGEN NACH INHALATIONSIMPfung
MIT EINEM POLYVALENTEN, BAKTERIELLEN
LYSATIMPfstoff IM TIERVERSUCH**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von Ekkehard Rautenberg aus Lühnde

Referent: Professor Dr.med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Professor Dr.med. K.Großgebauer

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fach-
bereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 8.Dez. 1976



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	3
Material und Methoden	
1) Versuchstiere	9
2) Impfstoff	9
3) Immunisierung	10
4) Impfdosis	11
5) Kulturmedium	12
6) Zellgewinnung	13
7) Auswertung der Versuche	16
V Versuchsergebnisse	18
Diskussion	30
Zusammenfassung	33
Literaturverzeichnis	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Schon aus dem Altertum ist bekannt, daß Herrscher, die sich vor Giftmorden fürchteten, sich mit minimalen Mengen damals üblicher Gifte oral immunisierten, so daß sie später gegen sonst tödliche Dosen geschützt waren. Seit experimentellen Untersuchungen von PAUL EHRLICH (9) erschien eine umfangreiche Literatur zum Thema der oralen Immunisierung (siehe 5). EHRLICH hatte 1891 Mäuse mit Pflanzenschutzgiften oral immunisiert und anschließend nachgewiesen, daß die Tiere gegen diese Gifte gut geschützt waren. Er legte mit seiner Seitenkettentheorie auch die Grundlagen der These der humoralen Immunität, die später besonders von BEHRING weiterentwickelt wurde (9). Da die Theorie der lokalen Immunität, die nach der Entwicklung der Phagozytentheorie von METSCHNIKOFF (30) besonders BESREDKA (3) vertrat, lange Zeit experimentell nicht ausreichend begründet werden konnte, trat sie gegenüber der humoralen zunächst in den Hintergrund (33). In neueren Untersuchungen konnte STICKL (48) zeigen, daß nicht nur humorale Antikörper für die Schutzwirkung einer Impfung verantwortlich sind, sondern auch lokale Immunsysteme und zellgebundene Antikörper hieran

beteiligt sind (20,25,42).Die lokale Immunisierung verlangte, die Eintrittsstelle des Erregers für virulente Keime ungangbar zu machen (52). Daß große Korpuskel durch die intakte Schleimhaut resorbiert werden können, VOLKHEIMER nannte dies später Persorption, hatte HERBST (17) schon 1844 nachweisen können, als er Stärkekörner, die durch die Schleimhaut resorbiert waren, unverändert im Ductus thoracicus vorfand. Erst von VOLKHEIMER (50) wurden diese Ergebnisse, obwohl 1906 von HIRSCH (19) bestätigt, erneut aufgezeigt (51). Er konnte nachweisen, daß eine Persorption von Korpuskeln im menschlichen Darm bis zu einer Größe von 110μ möglich ist. Diese Ergebnisse konnten auch von RAETTIG und Mitarbeiter mit T_3 -Coli-Phagen, *Candida albicans* und markierten Antigenen bestätigt werden (39). Er konnte auch im Dünndarm oral immunisierter Tiere mit Hilfe des PCA-Testes Reagine aufzeigen und so frühere Theorien stützen, die den Erfolg der oralen Immunisierung auf eine Anreicherung immunkompetenter Zellen und das Auftreten von Bakteriolytinen und Opsoninen in der Darmwand zurückführten (49). ALATYRTSEVA (1) beobachtete, daß nach lokaler Immunisierung eine Vergrößerung regionärer Lymphknoten mit Zellproliferation und RNA-Vermehrung auftritt und daher auch diese pri-

mär am immunologischen Prozeß beteiligt sind. Im Unterschied zu dem Prinzip der parazellulären Aufnahme an mit Schleimhaut ausgekleideten Oberflächen finden wir in den tieferen Lungenabschnitten, in den am Gasaustausch beteiligten Alveolen, phagozytierende Zellen, Alveolarmakrophagen (43,44,45). DANNENBERG (8) und OREN (32) untersuchten ihre biochemischen Leistungen, wobei letzterer eine starke Abhängigkeit der Phagozytoseaktivität von der oxydativen Phosphorylierung feststellte, während andere Makrophagen nicht so sehr auf die Anwesenheit von Sauerstoff angewiesen sind. GREEN (12,13,14) wies nach, daß sie für die Sterilität im unteren Respirationstrakt direkt verantwortlich sind (29). Über den Ursprungsort der Alveolarmakrophagen bestand lange Zeit Uneinigkeit. GODLESKI (11) bewies 1972 jedoch mit Hilfe immunologischer Methoden an bestrahlten Tieren, daß der Ursprungsort der Alveolarmakrophagen nicht die Lunge, sondern das hämopoetische System ist. Demnach stammen die Makrophagen von den Promonozyten des Knochenmarkes, entwickeln sich zu den Monozyten des Blutes und wandern von hier aus in die Gewebe, um dort ihre Aufgabe als Makrophagen wahrzunehmen (Tagung über mononukleäre Zellen, Leiden, Holland). Sie nehmen als mononukleäre,

phagozytäre Fresszellen Antigene auf und bauen sie zu übertragbaren, antigenetisch wirksamen Einheiten um. Während FISHMAN (10) annahm, daß als Informationsüberträger ein Bakterienantigen-Makrophagen-RNA-Komplex an thymusabhängige Lymphozyten weitergegeben wird, wird dies von anderen bezweifelt (41). WEISS (56) wiederum vermutet, daß die Informationsübertragung durch Emperipolese, die Einverleibung des intakten Lymphozyten in den Makrophagen als Zeichen engsten zytoplasmatischen Kontaktes oder durch interzelluläre Brückenbildung erfolge. HAHN (15) sieht einen engen Zusammenhang mit T-Lymphozyten, die zuerst auf das Antigen treffen. Er nimmt an, daß spezifisch reagible T-Lymphozyten die Rolle spezifischer Induktoren spielen, die die Makrophagen aktivieren und am Infektionsort konzentrieren. Hier übernehmen die Makrophagen dann die Aufgabe der Keimvernichtung, wobei sie, einmal aktiviert, unspezifisch wirksam sind. Hierbei geht er allerdings von zur Antigenerkennung befähigten Lymphozyten aus. Der Mechanismus, über den die Makrophagen aktiviert werden, ist im einzelnen noch nicht geklärt. So hemmt der Makrophagen-Immobilisationsfaktor (MIF, Migration-inhibitory-factor) die Wanderung der Makrophagen, erhöht aber andererseits

ihre Aufnahmefähigkeit (56,16), soll jedoch ohne Wirkung auf Alveolarmakrophagen sein (24). Außerdem wird die Phagozytoserate durch die Opsonierung wesentlich beeinflusst. Opsonin ist ein Serumbestandteil, der die Oberfläche der Phagozyten so verändert, daß die Aufnahme von Fremdkörpern erleichtert wird. Als Opsonine wirken bestimmte Antikörper mit adsorbiertem und teilweise denaturiertem Immunglobulin (7), das Komplementsystem mit oder ohne spezifische Antikörper, das Properdinsystem und andere Stoffe mit phagozytosesteigernder Wirkung wie z.B. Histi-one (18,31). Auch für die Alveolarmakrophagen von Mensch und Kaninchen konnten Rezeptoren für IgG und das C3b und C3d-Fragment nachgewiesen werden, sie ähneln also hierin den peripheren Blut-Monozyten (40). Eine Hemmung der Phagozytose durch körperfremde Substanzen fand auch BULMER (6), als er feststellte, daß Kapselpolysaccharide von *C. neoformans* die Phagozytose hemmen können.

Wenn auch viele Einzelfaktoren, die die Phagozytose beeinflussen, noch nicht geklärt sind, so scheinen die Alveolarmakrophagen doch eine wichtige Rolle bei der Infektabwehr in der Lunge zu spielen (6). In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, mit Hilfe eines polyvalenten, bakteriellen

Lysatimpfstoffes - IRS 19 - die Phagozytoserate der Alveolarmakrophagen durch eine Inhalationsimpfung zu beeinflussen (34,35,52), beziehungsweise sie spezifisch oder unspezifisch zu aktivieren und so die Stimulierung von Abwehrmechanismen zu erreichen.

Material und Methoden

1) Versuchstiere

Als Versuchstiere standen männliche, weiße NMRI- (Naval Medical Research Institute) -Mäuse aus der Zucht des Robert Koch-Institutes zur Verfügung. Ihr Durchschnittsgewicht betrug zu Beginn der Immunisierung 13g, zu deren Ende 27g. Sie wurden in Gruppen zu je 25 Tieren in Plastik Käfigen gehalten und mit Altromin und Leitungswasser ernährt.

2) Impfstoff

Zur Immunisierung wurde das Präparat der Firma Sarbach (Vertrieb und Lizenz in Deutschland: Hefafrenon Arzneimittel, 4712 Werne) IRS 19 verwandt.

Nach Angaben des Herstellers enthält es in 10%

Glykokoll gelöst folgende Bakterienbestandteile:

Diplococcus pneumoniae, Typ I	1,100ml
Diplococcus pneumoniae, Typ II	1,100ml
Diplococcus pneumoniae, Typ III	1,100ml
Diplococcus pneumoniae, Typ V	1,100ml
Diplococcus pneumoniae, Typ VIII	1,100ml
Diplococcus pneumoniae, Typ XII	1,100ml

Streptococcus pyogenes, Gruppe A	1,665ml
Streptococcus pyogenes, Gruppe C	1,665ml
Streptococcus faecalis, Gruppe D (S 19)	0,832ml
Streptococcus faecalis, Gruppe D (S 105)	0,832ml
Streptococcus pyogenes, Gruppe G	1,665ml
Micrococcus pyogenes, var. aureus	6,66 ml
Gafyka tetragena	3,33 ml
Neisseria catarrhalis	2,22 ml
Neisseria flava	2,22 ml
Neisseria perflava	2,22 ml
Haemophilus influenza	3,33 ml
Klebsiella pneumoniae	6,66 ml
Moraxella	3,33 ml
Na-Aethylmercuritthiosalicylat	0,0025 g
Neroli-Essenz	0,0025 g
Aqua dest.	100 ml

Danach entspricht jeder Milliliter Lysatimpfstoff dem Antigengehalt von 15×10^9 Erregern. Das Konzentrat hat eine zehnfach höhere Konzentration.

2) Immunisierung

Durch das Pari-Standard 088-Aerosolgerät (Paul Ritzau Pari-Werk KG) wurde ein Sprühnebel des Impfstoffes erzeugt, den jeweils 25 Mäuse in einem

modifizierten Blechkasten an zweimal fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit einer zweitägigen, dazwischenliegenden Pause inhalieren mußten (siehe auch 26,54). Nach Angaben des Herstellers betrug die Teilchengröße 0,5u bis 5,5u. In dreißig Minuten wurden 10 ml Impfstoff vernebelt, was einer Kompressorleistung von fünfzehn Litern pro Minute entspricht. Die Tiere blieben noch weitere fünfzehn Minuten im Käfig, danach war der Impfstoffnebel veratmet. Die gesamte Expositionszeit betrug also fünfundvierzig Minuten pro Tag. Von den Tieren wurde die Impfung gut vertragen.

4) Impfdosis

Das Gesamtgewicht des in der Verneblungskammer aufgenommenen Tropfens kann nach der vereinfachten Formel von BOLOTOVSKII (4) folgendermaßen berechnet werden:

$x = f \cdot V / l$ wobei

x = Gesamtgewicht der Tropfen in der Kammer (in g)

f = Durchschnittswert der erzeugten Spraykonzentration (in g/min) also 10/30min

V = Kammervolumen in Litern (30 l)

l = Leistung des Kompressors (15l/min)

daraus folgt:

$$x = \frac{1g \cdot 301 \cdot \text{min}}{3 \text{min} \cdot 151} = \frac{2}{3}g = \frac{1}{45} g/l = \frac{1}{45000} g/l$$

Das Atemvolumen der weißen Maus beträgt 1,1ml/min pro Gramm Körpergewicht. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht während der Immunisierung von zwanzig Gramm ergibt sich die vermutlich aufgenommene Antigenmenge A wie folgt:

$$A = \frac{1 \cdot 1,1 \cdot 20 \cdot Z}{45000} g = \frac{22 \cdot Z}{45000} g$$

wobei Z die Expositionszeit in Minuten ist (450min).

Ein Gramm IRS 19 enthält Antigene von 15×10^9 Keimen, ein Gramm IRS 19-Konzentrat Antigene von 15×10^{10} Keimen. Es ergibt sich eine vermutlich aufgenommene Dosis (A) von IRS 19 Keimantigenen:

$$A = \frac{11 \cdot 450}{1500} \cdot 10^9 = 3,3 \times 10^9$$

und von $3,3 \times 10^{10}$ Keimantigenen für IRS 19-Konzentrat.

Die Keimdosen liegen demnach jeweils im als optimal bestimmten Bereich (36,38).

5) Kulturmedium

Als Nähr- und Kulturflüssigkeit für die Alveolarmakrophagen wurde in beiden zeitkinetischen Versuchsreihen Eagle-Basal-Medium mit Zusatz von Earle's Salt und L-Glutamin verwendet. Von der Fir-

ma Mecron wurde eine fertige Trockensubstanz bezogen. Für jeden Versuchstag wurde eine frische Lösung hergestellt, die mit Natriumbikarbonat auf einen pH von 7,4 eingestellt wurde und der als Antibiotikum 10 Milligramm Kanamycin auf 100 Milliliter zugegeben wurde. In Anlehnung an KLUGER (21) wurde zur Opsonierung Neugeborenenkälberserum der Firma Mecron und Flow Laboratories zugegeben, wenn die Lösung als Kulturmedium benutzt wurde. Alle Lösungen wurden im Brutschrank auf 37°C vorgewärmt.

6) Zellgewinnung

Das Prinzip der Zellgewinnung besteht in einem Durchspülen der Atemwege mit einer Flüssigkeit. KOLLMEIER (23) führte "lung lavages" an ausgewählten Patienten durch. Bei Versuchstieren wurden in der Literatur zwei verschiedene Methoden beschrieben. Die eine, 1960 von MYRVIK (30) vorgestellt, verfeinert von OREN (32) und auf kleinere Tiere anwendbar gemacht, auch von BULMER (6) am Meerschweinchen verwandt, extirpierte die Lungen in toto. Erst außerhalb des Thorax wurde dann ihre innere Oberfläche gespült, um die Makrophagen zu gewinnen.

Die andere von MAXWELL (27) zuerst beschriebene, von GODLESKI (41) 1972 etwas veränderte Methode wandte auch ich in Anlehnung an KLUGER (21) an. Sie beläßt die Lunge bei den Waschungen im Thorax und ist präparativ einfacher. Wie KLUGER (21) verzichtete ich auf eine Anreicherung durch Zentrifugieren, da der Verdacht bestand, dies könne die Zellen schädigen. Zwischen dem dritten und achtzehnten Tag wurden die Mäuse intraperitoneal mit 0,15g pro Kg Körpergewicht Nembutal (Pentobarbital-Natrium) betäubt und das Abdomen eröffnet. Die Bauchorta wurde geöffnet und die Mäuse entbluteten. Im Unterschied zu KLUGER (21) wurde der Thorax weit eröffnet, die Rippen beidseits in der Mamillarlinie durchtrennt und mit dem Sternum entfernt. So konnte die Spülung unter Beobachtung der Lungenentfaltung mit geringerem Spüldruck vorgenommen werden, was, wie Vorversuche zeigten, zu einer Verbesserung der Ergebnisse führte. Anschließend wurde die Trachea freipräpariert und vorsichtig kurz oberhalb des Thorax inzidiert. Danach führte ich eine 17er Kanüle, der ein kurzer, steriler Polyäthylenschlauch aufsaß, in die Trachea ein und fixierte sie mit einer Klemme. Durch zehnmaliges In- und Aspirieren mit einem

Milliliter 37°C warmer, isotoner Kochsalzlösung wurde eine Zellsuspension gewonnen, welche in eine, schon zwei Milliliter NaCl-Lösung enthaltende, Gewebekulturflasche (Falcon Plastics) gegeben wurde und dreißig Minuten im Brutschrank blieb. Zum Gebrauch der Plastikflaschen kam ich in Anlehnung an SCHULZE (46) und KLUGER (21), um gleiche Voraussetzungen gewährleisten zu können und da sich so die Kontaminationsgefahr gering halten ließ. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel mit vier Milliliter sterilfiltriertem Eagle-Basal-Medium, welches mit Kohlendioxid aequilibriert war. Hierbei war darauf zu achten, daß die Sauerstoffspannung nicht zu stark abfiel. Nach vierundzwanzig Stunden im Brutschrank bei 37°C wurden 0,01 Milliliter Streptokokkensuspension der Keimdichte $3 \times 10^9/\text{ml}$ zugegeben und den Makrophagen eine Stunde Zeit zur Phagozytose gelassen. Hiernach wurde das Nährmedium entleert und mit physiologischer Kochsalzlösung vorsichtig gespült, um Lymphozyten, Leukozyten, Serumreste und extrazelluläre Streptokokken zu entfernen. Dieser Schritt war besonders für die aktivierten Zellen entscheidend. Wurde zu intensiv gespült, wurden sie zerstört. Daher konnten bei vorsichtiger Spülung teilweise nicht alle extrazellulären Partikel

entfernt werden. Anschließend wurde der Flaschenboden entfernt, das Präparat an der Luft getrocknet, methylalkoholfixiert und nach Giemsa gefärbt. Jedes so gewonnene Präparat enthielt etwa 10^5 bis 10^6 Zellen, von denen bei stichprobenartigen Kontrollen 85% bis 90% Trypanblau ausschlossen und somit lebten. Gearbeitet wurde in sterilen Impfkapellen, die in ihrerseits UV-ausgestrahlten Räumen standen, um die Kontaminationsgefahr gering zu halten. Wegen der unvermeidbaren primären Kontamination mit trachealen Keimen konnte auf die Anwendung eines Antibiotikums (Kanamycin) nicht verzichtet werden.

7) Auswertung der Versuche

Von jeder Maus wurde auf diese Weise ein Präparat hergestellt, das unter Ölimmersion bei eintausendfacher Vergrößerung ausgewertet wurde. Ungefähr fünfhundert Zellen aus allen Abschnitten des Präparates wurden geprüft, wobei nach SCHULZE (46) als Zeichen der Phagozytose gewertet wurde, wenn mindestens drei Streptokokken in einer Reihe eindeutig zu erkennen waren. Hierbei blieben Zahl der phagozytierten Keime und Aktivitätsgrad unberück-

sichtigt. Bei der Auswertung der Präparate war unbekannt, ob es sich um immunisierte oder nicht immunisierte Tiere handelte. Das Verhältnis bei der Zellzahlen zueinander war ebenfalls unbekannt. Allerdings ließ ein unterschiedlicher Aktivierungsgrad Rückschlüsse auf die Tiergruppe zu. Die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen wurde gleich hundert gesetzt, die Phagozytoserate in Prozent davon ausgedrückt.

Versuchsergebnisse

Die Versuche wurden als zeitkinetische Messreihen in zwei Gruppen durchgeführt:

1. Gruppe: mit IRS 19 immunisierte Tiere

2. Gruppe: mit IRS 19-Konzentrat immunisierte Tiere

Die Immunisierung erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema. Jeweils am dritten, sechsten, zehnten, dreizehnten bzw. vierzehnten und achtzehnten Tag nach beendeter Immunisierung wurden die Makrophagen gewonnen. In den Tabellen eins und zwei sind die Ergebnisse der Impfung mit IRS 19 wiedergegeben. In Abbildung 1 sind diese Ergebnisse dargestellt, indem die jeweiligen Mittelwerte (aus Tabelle 2) die Höhe der Säule bestimmten. Der Vergleich mit den Kontrolltieren zeigt eine Steigerung der Phagozytoserate ab dem sechsten Tag auf 150%, aber erst ab dem zehnten Tag eine Verdopplung auf ein dann konstant bleibendes Niveau von etwa 200% (siehe auch Tabelle 5 und Abbildung 3). Die Ergebnisse von WALTER (54) legten die zweite Versuchsreihe nahe, in der ein Konzentrat des Lysatimpfstoffes verwendet wurde, um eine von WALTER festgestellte eventuelle Schädigung des Immunsystems durch irgendeinen Bestandteil des Impfstoffes

Tage nach letzter Impfung	Nummer des Tieres	Mit IRS 19 geimpfte Tiere				Kontrolltiere			
		insge- samt ausge- wertete Zellen	davon		% -Satz der Phago- cytose	insge- samt ausge- wertete Zellen	davon		% -Satz der Phago- cytose
			pos.	neg.			pos.	neg.	
3	1	510	81	429	15,9	501	47	454	9,6
3	2	506	53	453	10,4	502	35	467	7,0
3	3	522	56	466	10,7	506	33	473	6,5
3	4	510	48	462	9,4	524	68	456	13,0
3	5					502	49	453	9,7
6	1	508	139	369	27,4	504	96	408	19,2
6	2	505	148	357	29,3	511	72	439	14,2
6	3	528	137	391	26,0	505	83	422	16,4
6	4	508	129	379	25,4	502	105	397	20,8
6	5	507	156	351	30,8				
10	1	509	178	331	35,0	503	54	449	10,7
10	2	506	156	350	30,8	509	71	438	14,0
10	3	501	184	317	36,6	502	101	401	20,2
10	4	507	214	293	42,3	512	127	385	24,8
10	5	510	172	338	33,8	513	62	451	12,2
13	1	506	249	257	49,2	512	121	391	23,7
13	2	503	226	277	45,0	506	87	419	17,4
13	3	514	212	302	41,3	509	142	367	27,7
13	4	508	229	279	45,1	506	117	389	23,1
18	1	504	206	298	41,0	507	114	393	22,5
18	2	513	221	292	43,2	504	73	431	14,5
18	3	505	252	253	50,0	512	129	383	25,2
18	4	500	217	283	43,4	506	99	407	19,6
18	5	511	241	270	47,0				

Tabelle 1: Einzelergebnisse der ersten Versuchs-
gruppe (Immunisierung mit IRS 19)

Tage nach letzter Impfung	Zahl der Mäuse	Mit IRS 19 geimpfte Tiere				Kontrolltiere			
		insge- samt ausge- wertete Zellen	davon pos. neg.	%-Satz der Phago- cytose		insge- samt ausge- wertete Zellen	davon pos. neg.	%-Satz der Phago- cytose	
3	9	2048	238	1810	11,6	2545	232	2303	9,1
6	9	2556	709	1847	27,8	2022	356	1666	17,4
10	10	2533	904	1629	35,3	2539	415	2124	16,4
13	8	2031	916	1115	45,1	2033	467	1566	23,0
18	9	2533	1147	1386	45,3	2029	418	1611	20,6

Tabelle 2: Ergebnisse der ersten Versuchsgruppe
(Immunisierung mit IRS 19)

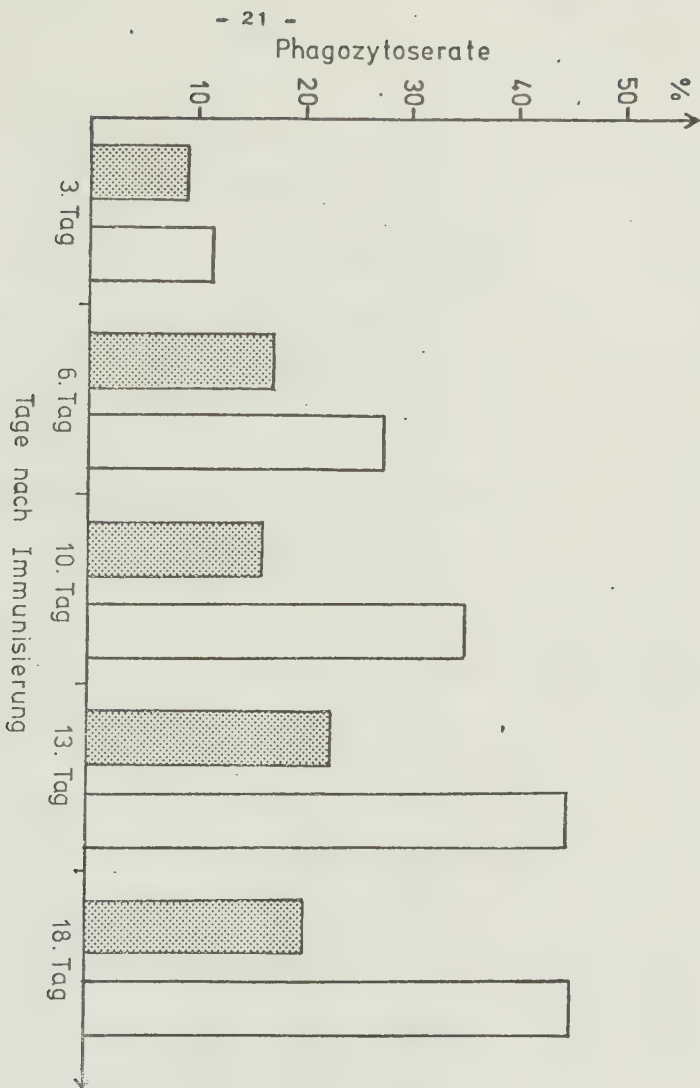


Abbildung 1: Phagozytoserate der ersten Versuchs-
gruppe (Immunisierung mit IRS 19)

(zB, Neroli-Essenz) auszuschließen. Da durch einen Fehler in der Versuchsvorbereitung am dreizehnten Tag die Versuche sämtlich mißlangen, wurden sie bei dieser Versuchsreihe am vierzehnten Tag wiederholt (Tabelle 3, Tabelle 4). Leider waren jedoch nur noch wenige Mäuse von dieser Impfreihe vorhanden, so daß vom vierzehnten Tag nur eine relativ niedrige Vergleichszahl vorliegt (Tabelle 3). Diese Versuchsreihe zeigt einen Anstieg der Phagozytosewerte gegenüber den Kontrolltieren schon am dritten Tag (auf 130%), am sechsten Tag schon eine Verdopplung, um über 280% am zehnten, auf 380% am vierzehnten Tag anzusteigen und anschließend am achtzehnten Tag wieder deutlich abzufallen (220%) (Abbildung 2, Tabelle 6). An allen Tagen ist ein deutlicher Anstieg gegenüber der Impfung mit IRS 19 zu verzeichnen (Abbildung 3). Diese Ergebnisse werden eventuell etwas verfälscht durch eine Schwankung der Phagozytosebasalwerte, also der Phagozytoserate der Kontrolltiere in den beiden Versuchsreihen (Tabelle 1, Tabelle 3). In der ersten Gruppe betrug sie 17,3% (Tabelle 2), in der zweiten jedoch nur 13,8% (Tabelle 4). Diese Schwankung ist wohl dadurch zu erklären, daß es unter den gegebenen Bedingungen kaum möglich war,

Tage nach letzter Impfung	Nummer des Tieres	Mit IRS 19-Konzentrat geimpfte Tiere				Kontrolltiere			
		insge- samt ausge- wertete Zellen	davon pos. neg.	%-Satz der Phago- cytose		insge- samt ausge- wertete Zellen	davon pos. neg.	%-Satz der Phago- cytose	
3	1	506	73	433	14,4	507	34	473	6,7
3	2	504	98	406	19,4	508	95	413	18,6
3	3	506	68	438	13,4	504	53	451	10,5
3	4	505	85	420	16,8	518	46	472	8,9
3	5	507	49	458	9,8	504	57	447	11,3
6	1	503	184	319	36,6	508	75	433	14,8
6	2	508	123	385	24,3	508	81	427	15,9
6	3	504	167	337	33,3	505	49	456	9,7
6	4	511	130	381	25,4	515	106	409	20,4
6	5	511	114	397	22,3	525	59	466	11,2
10	1	504	183	321	36,3	503	61	442	12,1
10	2	509	212	297	41,7	511	54	457	10,6
10	3	508	191	317	37,6	510	79	431	15,5
10	4	501	176	325	35,0	502	86	416	17,1
10	5	507	214	293	42,2				
14	1	501	194	307	38,8	507	29	478	5,7
14	2	505	183	322	36,2	501	64	437	12,8
14	3	515	139	376	27,0				
18	1	508	251	257	49,4	501	81	420	16,2
18	2	513	233	280	45,5	513	126	387	24,6
18	3	511	207	304	40,5	512	117	395	22,8
18	4	519	261	258	50,4	503	92	411	18,3
18	5	512	228	284	44,6				

Tabelle 3: Einzelergebnisse der zweiten Versuchsgruppe
(Immunisierung mit IRS 19-Konzentrat)

Tage nach letzter Impfung	Zahl der Mäuse	Mit IRS: 19-Konzentrat				Kontrolltiere			
		geimpfte Tiere		% - Satz		davon		% - Satz	
		insge- samt	davon pos.	neg. der Phagocy- tose		insge- samt	davon pos. neg.	ausge- wertete	der Phago- cytose
		ausge- wertete	Zellen			ausge- wertete	Zellen		
3	10	2528	373	2155	14,8	2541	285	2256	11,2
6	10	2537	718	1819	28,3	2561	370	2191	14,4
10	9	2529	976	1553	38,6	2036	280	2036	13,8
14	5	1521	546	975	35,4	1008	93	915	9,3
18	9	2563	1180	1383	46,0	2029	416	1613	20,5

Tabelle 4: Ergebnisse der zweiten Versuchsgruppe
(Immunisierung mit IRS 19-Konzentrat)

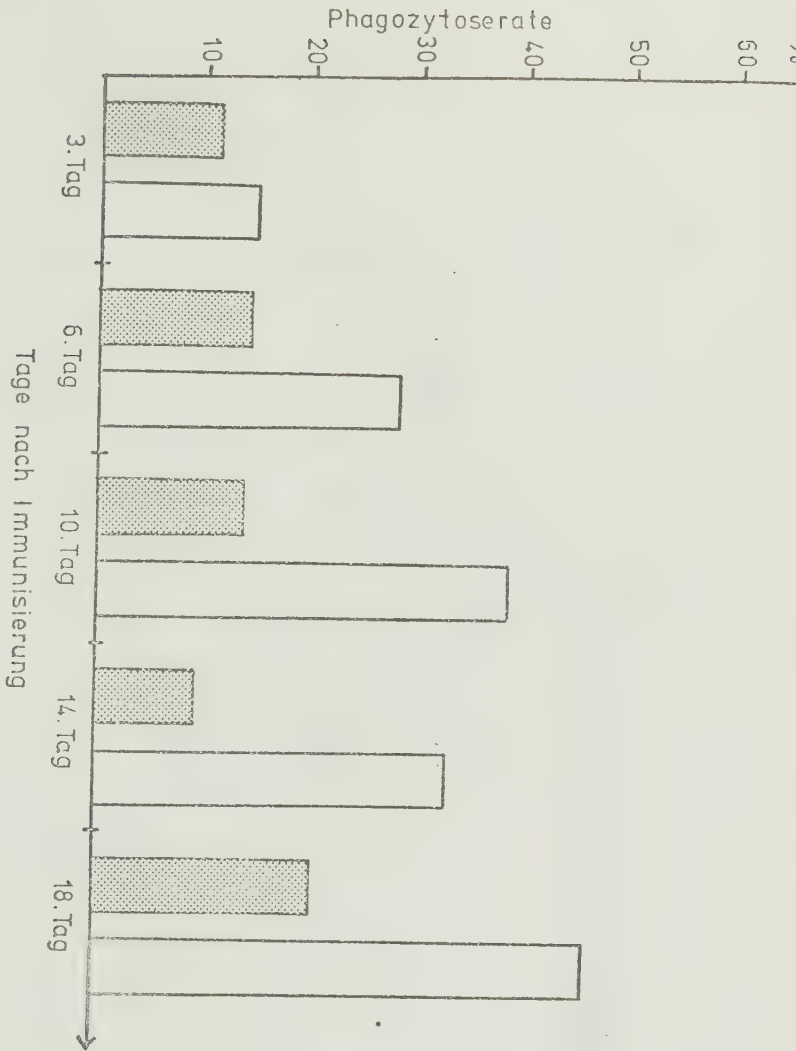


Abbildung 2: Phagozytoserate der zweiten Versuchsgruppe (Immunisierung mit IRS 19-Konzentrat)

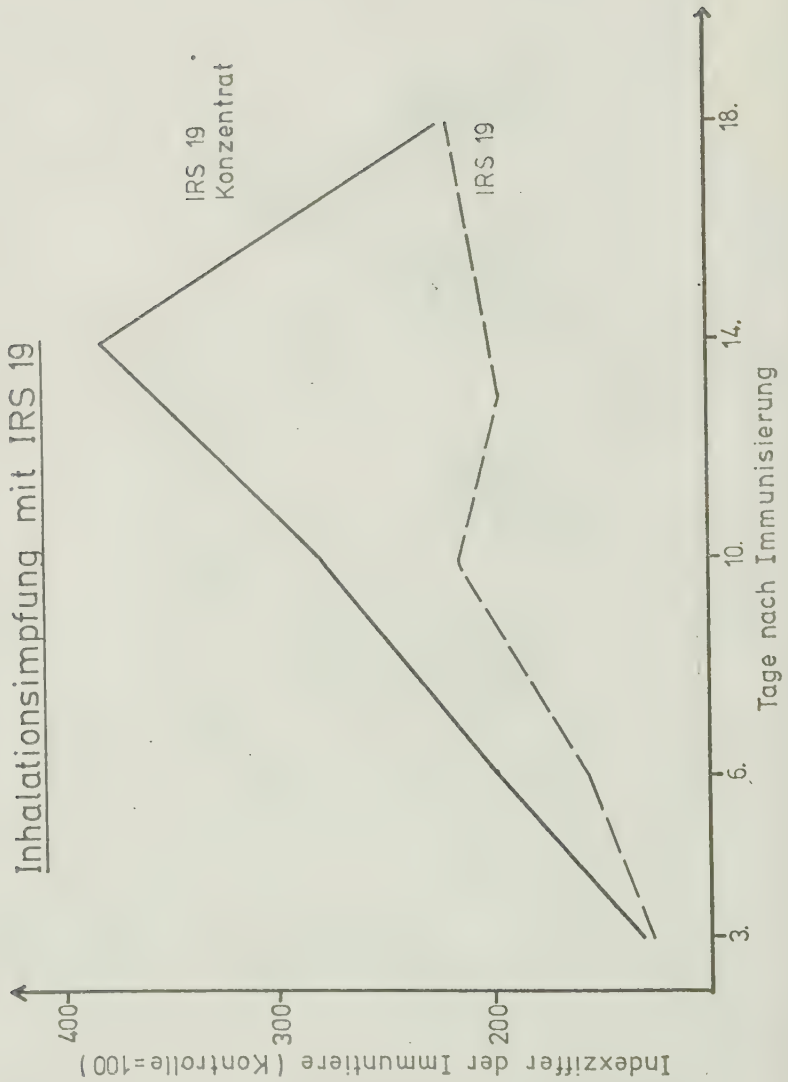


Abbildung 3: Vergleich der beiden Versuchsgruppen

exakt gleiche Bedingungen für die Aufzucht der Tiere einzuhalten. Daher konnten die einzelnen Tiergruppen unterschiedlich engen Kontakt mit dem Phagozytosekeim, Streptokokken, haben. Selbst, wenn man dies berücksichtigt, bleibt ein deutlicher Impferfolg in der ersten Versuchsreihe festzustellen (Tabelle 5) und eine erhebliche Steigerung in der zweiten Versuchsreihe (Tabelle 6) gegenüber der ersten (Abbildung 3).

Die statistische Sicherung der Ergebnisse nach der Methode von KOLLER (22) ergibt, daß statistische Echtheit dann gegeben ist, wenn der Quotient "beobachtete Differenz" zu "größtzulässiger Zufallsdifferenz" größer als eins ist. Wie die Tabellen fünf und sechs zeigen, ist insgesamt ein hoher Grad an Echtheit gegeben, jedoch kann der erste Wert der ersten Versuchsreihe (dritter Tag) mit 0,91 (Tabelle 5) noch nicht als statistisch gesichert gelten.

Tage nach letzter Impfung	Mit IRS 19 geimpfte Tiere		Kontrolltiere		Db in %	Dz	Db/Dz =E	Index- ziffern
	Zahl der Zellen Phago- cytose	%-Satz der Zellen Phago- cytose	Zahl der Zellen Phago- cytose	%-Satz der Zellen Phago- cytose				
3	2048	11,6	2545	9,1	2,5	2,75	0,91	123
6	2556	27,8	2022	17,4	10,4	3,60	2,89	156
10	2533	35,3	2539	16,4	18,9	4,00	4,73	215
13	2031	45,1	2033	23,0	22,1	4,80	4,60	196
18	2533	45,3	2029	20,6	24,7	4,15	5,95	219

Tabelle 5: Statistische Sicherung: Erste Versuchsgruppe
(Immunisierung mit IRS 19)

Tage nach letzter Impfung	Mit IRS 19 Konz. geimpfte Tiere	Kontrolltiere	Db in %	Dz	Db/Dz =E	Index- ziffern	
	Zahl der Zellen Phago- cytose	%-Satz der Zellen Phago- cytose	Zahl der Zellen Phago- cytose				
3	2528	14,8	2541	11,2	3,6	2,80	132
6	2537	28,3	2561	14,4	13,9	3,10	197
10	2529	38,6	2036	13,8	25,8	3,35	280
14	1521	35,4	1008	9,3	26,1	3,90	382
18	2563	46,0	2029	20,5	25,5	3,80	224

Tabelle 6: Statistische Sicherung: Zweite Versuchsgruppe
(Immunisierung mit IRS 19-Konzentrat)

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß mit der beschriebenen Methode nach Impfung mit dem Lysatimpfstoff eine beträchtliche Steigerung der Phagozytoserate festzustellen ist. In der Literatur herrscht Übereinstimmung darüber (2,21,46,47), daß die Phagozytose einen wesentlichen Faktor der Infektabwehr darstellt und sie der erste und essentielle Schritt in der Auseinandersetzung des Organismus mit dem Fremdmaterial ist. Die Phagozytoserate bietet sich daher als Maßstab an, um die Wirkung der Immunisierung zu beschreiben, was im Rahmen dieser Arbeit mit hoher statistischer Signifikanz gelang (Tabelle 5, Tabelle 6). Technische und biologische Variable und Fehlerquellen wurden an den entsprechenden Stellen dieser Arbeit bereits erwähnt. So ließ sich die Antigenaufnahme während der Inhalationsimmunisierung nicht absolut genau bestimmen, in vitro ließen sich geringe Schwankungen von Temperatur, pH-Wert, CO_2 -Partialdruck, vor allem aber der Sauerstoffspannung gegenüber der Alveolarmakrophagen besonders empfindlich reagieren, nicht ganz vermeiden. Eine weitere Fehlerquelle bestand in der Dosierbarkeit des Phagozytosekeimes. Zu intensives Spülen zerstörte besonders

die aktivierten Zellen, so daß bei ausreichendem Streptokokkenangebot pro Makrophagen und vorsichtiger Spültechnik sich Überlagerungsphänomene von Streptokokken und Makrophagen nicht ganz ausschließen ließen. Hier seien auch noch einmal die Ergebnisse von KLUGER (21) erwähnt, der, allerdings mit ähnlichen Fehlermöglichkeiten behaftet, bei den Kontrolltieren eine annähernd gleich hohe Phagozytoserate der Alveolarmakrophagen feststellte. Es läßt sich auch nicht mit Sicherheit sagen, ob die beschriebene Wirkung ausschließlich ein Ergebnis der lokalen Inhalationsimmunisierung ist. Es ist anzunehmen, daß ein Teil des Impfstoffes verschluckt oder von den Wänden des Käfigs abgeleckt wurde und daß daher diese orale Immunisierung ebenfalls an dem Impferfolg beteiligt war. Da die Tiere sich häufiger bisßen und einige von ihnen zum Zeitpunkt der Präparation offene oder frisch verschorfte Wunden aufwiesen, können diese Tiere sogar geringgradig parenteral immunisiert worden sein. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit zwar eine Zeitkinetik der Phagozytoserate festgestellt werden, es ließ sich jedoch nicht beurteilen, ob die Makrophagen den angebotenen Keim auch töten oder ob die eigentliche Keimtötung durch andere, etwa durch Entzündungs-

vorgänge geschieht, wie manche es vermuten (6). Es wäre daher interessant, wie weit lokale Antikörper die Makrophagen stimulieren, als Opsonin wirken, oder wie weit diese gehemmt werden. Nach WALKER (53) können jedoch Makrophagen nach Immunisierung selbst Antikörper produzieren. Obwohl als Kulturmedium Kälberserum von acht Tage alten Kälbern benutzt wurde, konnte auch hier nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, daß diaplazentar auf die Kälber übertragene Antikörper gegen Streptokokken in das System gelangten. Die Wahrscheinlichkeit spricht allerdings dafür, daß spezifische Antikörper nicht, oder aber zumindest nicht in nennenswertem Ausmaß in das Versuchssystem kamen. Nicht von Makrophagen produzierte Antikörper waren daher nicht erforderlich. Da in dem Lysatimpfstoff Streptokokkenkeime zu einem Sechstel enthalten sind, läßt sich bei dem beschriebenen Versuchsansatz nicht entscheiden, wie groß der spezifische und unspezifische Wirkanteil gewesen sind (37). Es wäre daher sehr interessant, diese Fragen durch weitere Versuche abzuklären, durch Berücksichtigung dieser Parameter eventuell noch vorhandene Fehlerquellen auszuschließen.

Zusammenfassung

Mit einer Methode zur Untersuchung der Phagozytosefähigkeit der Alveolarmakrophagen der Maus wurde anhand zweier zeitkinetischer Meßreihen der Impferfolg von IRS19 und einem Konzentrat dieses polyvalenten bakteriellen Lysatimpfstoffes festgestellt. Eine eindeutige Dosisabhängigkeit mit Anstieg der Phagozytoserate bis zum dreizehnten Tag und anschließendem Abfall und deutlich höheren Werten bei dem Konzentrat ließ sich festhalten. Die Bedeutung der Makrophagen für den Impferfolg und die Ergebnisse wurden anhand der Literatur diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. Alatyrtseva, I.E.; Mayansky, A.N.
Single intranasal revaccination with diphtheria-tetanus toxoid
J. Microbiol. (Moscow) 5, 81-84 (1967)
2. Allen, E.G.; Mudd, S.
Protection of mice against vaccinia virus by bacterial infection und sustained stimulation with specific bacterial antigens
Inf. Imm. 7, 62 (1973)
3. Besredka, A.
Die lokale Immunisierung
Barth Verlag Leipzig 1926
4. Bolotowskii, V.M.
I. Theory of work of the IBK-1 aerosol chamber for the study of experimental respiratory infections
II. Evaluation of aerosol from certain physical parameters
Problems of Virology 6: 492 und 497 (1961)
5. Breuel, H.
Lokale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
Inaug. Diss. F.U. Berlin 1969

6. Bulmer, G.S.; Tacker, J.R.
Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by
alveolar macrophages
Infect. Immun. 11 73-79 (1975)
7. Burnet, M.
Körpereigene und körperfremde Substanzen ...
Immunprozessen
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1973
8. Dannenberg, A.M.; Burstone, M.S.; Walter, P.C.;
Kinsley, J.W.
Histochemical study of Phagocytic and enzymatic
functions of rabbit mononuclear and poly-
morphonuclear exsudate cells and alveolar
macrophages
J. of Cell Biology 17: 465-486 (1963)
9. Ehrlich, P.
Experimentelle Untersuchungen über Immunität
Dt. med. Wochenschrift 1891, S 976 und S 1218
10. Fishman, M.
Antibody formation in vitro
J. Exper. Med. 114: 837-856 (1961)
11. Godleski, J.J.; Brain, J.D.
The origin of alveolar macrophages in mouse
radiation chimeras
J. Exper. Med. 136: 630-643 (1972)

12. Green, G.M.
Pulmonary clearance of infectious agents
Annual Review of Medicine 19:315-336 (1968)
13. Green, G.M.
Pulmonary Defense Mechanisms
S.Zeitschr.Kinderchir. 8: 69-77 (1970)
14. Green, G.M.; Kass, E.H.
The role of alveolar macrophage in clearance
of bacteria from lung
J.Exper.Med. 119: 167-176 (1964)
15. Hahn, H.
Zelluläre antibakterielle Immunität
Zbl.Bakt.Hyg., I Abt. Orig. A 227: 184-195 (1974)
16. Hay, J.B.; Lachmann, P.J.; Trnka, Z.
The appearance of migration inhibition
factor and a mitogen in lymph draining tuber-
culin reactions
Europ.J.Imm. 3 (1973) 127-131
17. Herbst, G.
Das Lymphgefäß-System und seine Verrichtun-
gen, Göttingen 1844 zitiert in
G.Volkheimer,
Zschr.f.Gastroenterologie 2, 57-64 (1964)
18. Hirsch, J.G.; Strauss, B.
Studies on heat-labile Opsonin in rabbit Serum
J.Immunol. 92: 145-154 (1964)

19. Hirsch, R.
Über das Vorkommen von Stärkekörnern in Blut
und Urin
Zschr. exper. Path. u. Ther. 3, 390 (1906)
20. Jerne, N.; Nordin, A.; Henry, C.
The Agar-Plaque Technique for Recognizing
Antibody-Producing Cells
Wistar Inst. Press S. 109-125 (1963)
21. Kluger, E.
Einfluss der Inhalationsimpfung auf die Phago-
zytosefähigkeit von Alveolarmakrophagen der
Maus
Inaug. Diss. F.U. Berlin 1975
22. Koller, S.
Neue graphische Tafeln zur Beurteilung
statistischer Zahlen, 4. Auflage
Dr. Dietrich Steinhoff-Verlag, Darmstadt 1969
23. Kollmeier, H.; Maaß, D.; Schottky, H.
Erfahrungen mit "lung lavage"
Med. Welt 24/24 : 1014-1016 (1973)
24. Leu, R. W.; Eddleston, A. L. W. F.; Hadden, J. W.; Good, R. A.
Mechanism of action of migration inhibitory
factor (MIF).
I. Evidence for a receptor for MIF present on
the peritoneal macrophage but not on the

alveolar macrophage

- J. Exper. Med. 136: 589-603 (1972)
25. Levanon, Y.; Raettig, H.; Rossetini, S.
Positive Immunological Reaction of Gut Cells
from Orally Immunized Animals Demonstrated by
Passive Cutaneous Anaphylaxis
Experientia 24, S. 600 (1968)
26. Marvik, G.
Tierversuche zur Inhalationsimpfung mit inakti-
vierten *S. typhi murium* Bakterien
Inaug. Diss. F.U. Berlin 1966
27. Maxwell, K.W.; Dietz, T.; Marcus, S.
An in situ method for harvesting guinea pig
alveolar macrophages
Amer. Rev. Resp. Dis. 89: 579-580 (1964)
28. Metschnikoff, E.
Immunität bei Infektionskrankheiten
Gustav Fischer Verlag, Jena 1902
29. Myrvik, Q.N.
Function of the alveolar macrophage in im-
munity
J. of Reticuloendothelical Society 11: 459-468
(1972)
30. Myrvik, Q.N.; Leake, E.S.; Fariss, B.
Studies on pulmonary alveolar macrophages from

the normal rabbit: technique to procure them
in high state of purity

Journal of Immunology 86: 128-132 (1961)

31. Opferkuch, W.

Humorale Mechanismen der körpereigenen Abwehr

Zbl.Bakt.Hyg.1.Abt.Orig. A 227, 159 (1974)

32. Oren, R.; Famham, A.E.; Saito, K.; Milofsky, E.;

Karnovsky, M.L.

Metabolic patterns in three types of phago-
cytizing cells

Journal of Cell Biology 17: 487-501 (1963)

33. Raettig, H.

Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem

Antigen gegen bakterielle Darminfektionen

(Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr)

Zbl.Bakt.Hyg. 1. Abt.Ref. 183, S. 1 (1962)

34. Raettig, H.

Provokation einer Infektion durch Schutzimpfung

8.Mitteilung: Vermeidung der Provokation durch

lokale Anwendung des Antigens

Zbl.Bakt.Hyg. 1. Orig. 187, 366 (1962)

35. Raettig, H.

Provokation einer Infektion durch Schutzimpfung

10.Mitteilung: Vermeidung der Provokation einer

Virusinfektion durch orale Impfung

mit inaktiviertem Virus während
der Inkubationszeit

Zbl.Bakt.Hyg. 1. Orig. 200,448 (1966)

36. Raettig, H.

Orale Immunisierung mit nicht vermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen

1. Mitteilung: Der Grundversuch zur Schutz-
impfung der Maus gegen eine
Enteritis-Infektion

Zbl.für Bakt., Parasitenkunde, Infektionskrank-
heiten und Hygiene 1. Orig. 193: 398-410 (1964)

37. Raettig, H.

Orale Immunisierung mit nicht vermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
2. Mitteilung: Experimente zur unspezifischen
Schutzimpfung bei Enteritis-In-
fektion der Maus

Zbl. für Bakt., Parasitenkunde, Infektionskrank-
heiten und Hygiene 1. Orig. 197: 368-388 (1965)

38. Raettig, H.

Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorga-
nismen. Zehn Jahre Forschungsarbeit im
Robert-Koch-Institut

Bundesgesundheitsblatt 14, 141 (1971)

39. Raettig, H.
Möglichkeiten der lokalen Immunisierung
Symposion "Immunreaktion im Respirationstrakt"
1972
40. Reynolds, H.Y.; Atkinson, J.P.; Newball, H.H.;
Frank, M.M.
Receptors for Immunglobulin and Complement on
Human Alveolar Macrophages
J. of Immunology 114 (1975) 1813-1818
41. Roelants, G.E.
Biochemical evidence against a physiological
role for macrophage RNA-antigen complexes in
the immune induction aus:
Dumonde, D.C. : The role of lymphocytes and
macrophages in the immunological response
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1971)
42. Rossetini, S.; Levanon, Y.; Raettig, H.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfä-
higen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
7. Mitteilung: Nachweis immunkompetenter Zellen
im Dünndarm oral geimpfter Versuchstiere
Zbl. f. Bakt. I Orig. 208, S. 16 (1968)
43. Schiessle, W.
Über die Vorgänge bei der Inhalation von Aerosolen

in der normalen Lunge

Zschr.Aerosolforsch.und Therapie 1-2: 364-377
(1952/1953)

44. Schiessle,W.;Steiner,H.

Geschichte der Bakterieninhalation I und II
Zbl.Biol.Aerosolforschung und Therapie 10,
304-325 und 411-429 (1962)

45. Schiessle,W.;Steiner,H.

Geschichte der Tröpfcheninhalation I und II
Zbl.Biol.Aerosolforschung und Therapie 9,
365-382 und 468-487 (1960/1961)

46. Schulze,H.-J.

Einfluß der oralen Immunisierung auf die Phago-
zytosefähigkeit von Peritonealmakrophagen der
Maus

Inaug.Diss.F.U. Berlin 1972

47. Shayegani,M.;Lief,F.S.;Mudd,S.

Specific and nonspecific cell-mediated resista-
to the influenza virus in mice
Infec.Immun 2,991 (1974)

48. Stickl,H.;Grottemeyer,P.

Vaccinaler Immuntransfer mit Zellfraktionen
immunkompetenter Zellen

Z.med.Mikrob. u.Immunol.154,S.80 (1968)

49. Necker, W.; Meyes, W.; Paettig, P.
Totale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
6. Mitteilung: Tierversuche zur Resorption und Sekretion von radiomarkierten bakteriellen Antigenen
Zbl.f.Bakt., Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I Orig. 208:2-15 (1968)
50. Volkheimer, G.; Wendland, H.; Wagemann, W.; et al.
Beobachtungen zum Persorptionsmechanismus
Path. Microbiol. 31, 51-58 (1968)
51. Voss, H.
Virus und Polyelektrolyte
2. Mitteilung: Bedeutung der Polyelektrolyte für die Abwehr antigenwirksamer Substanzen
Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 193, 1 (1964)
52. Waldman, R.H.; Wood, S.H.; Torres, E.J.; Small, P.A.
Influenza antibody response following aerosol administration of inactivated virus
Am. J. Epid. 91, 575 (1970)
53. Walker, W.
Macrophage Functional Heterogeneity in the In Vitro Induced Immune Response
Nature, New Biol. 229, S.211 (1971)

54. Walter, G.
Unspezifische bakterielle Inhalationsimpfung
bei Mäusen gegen Influenza virus - Inhalations-
infektion
Inaug.Diss. F.U. Berlin 1976
55. Wasser, A.; Citron, J.
Über die Bildungsstätten der Thymusimmunkörper
Zschr.f.Hyg. 50,331 (1905)
56. Weiss, L.
The cells and tissues of the immune system
Prentice-Hall, Inc. 1972, Englewood Cliffs, New
Jersey

Herrn Prof.Dr.med.Raettig danke ich für die
freundliche Überlassung des Themas und die viel-
fältigen Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit.
Fräulein Ch.Jaschinski danke ich für ihre Hilfe
bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 10. Oktober 1949 wurde ich als zweites von vier Kindern in Löhnde/Kreis Hildesheim geboren.

1956 eingeschult, legte ich nach 12jähriger Schulzeit im Sommer 1968 am humanistischen Kaiser-Wilhelm-Gymnasium in Hannover meine Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich 3 Semester in Freiburg Jura, arbeitete 1 1/2 Jahre als Pflegehelfer in verschiedenen Krankenhäusern, bis ich zum Sommersemester 1971 eine Zulassung zum Medizinstudium in Marburg bekam. Im anschließenden Wintersemester wechselte ich nach Göttingen, wo ich im April 1972 die naturwissenschaftliche und im Februar 1973 die ärztliche Vorprüfung bestand. Seit dem Sommersemester 1973 setzte ich mein Studium an der F.U. Berlin fort, an der ich im Oktober 1976 das Staatsexamen bestand.

